

D1

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01042498 A**

(43) Date of publication of application: **14 . 02 . 89**

(51) Int. Cl

**C07H 15/252
C12P 19/56**

(21) Application number: **62196519**

(22) Date of filing: **07 . 08 . 87**

(71) Applicant: **BIOGAL GYOGYSZERGYAR**

(72) Inventor:
**BALINT JANOS
EMRI ZSUZSANNA
JOZSEF FAZEKASCH
ATTILA JACOB
TOTH GYOERGY**

**(54) IMPROVEMENT IN RECOVERING
DAUNORUBICIN HYDROCHLORIDE FROM
FERMENTATION LIQUID**

(57) Abstract:

PURPOSE: To industrially advantageously obtain the subject compd. which is useful for anti-carcinoma drugs, etc., by extracting a fermentation liquid with a water-insoluble soln. and thickening the extraction liquid by evaporation, then processing the liquid in a column contg. silica gels and eluting the compd. with a mixture of formic acid-contg. chloroform-methanol.

CONSTITUTION: The fermentation liquid is extracted with the solvent (e.g. (n)- butanol, etc.), which does

not dissolve in water and the extraction liquid is thickened by evaporation to form the precipitate of crude product, following which the crude product is filtered and dried. Next, the crude product is dissolved in methanol, etc., and is passed through the column in which the silica gels are included as adsorbents to adsorb the product. The adsorbed matter is then eluted by using an eluting agent consisting of a mixture composed of the chloroform in which the formic acid is included and the methanol. The fraction in which the daunorubicin hydrochloride is included is thickened by evaporation and the product is recrystallized in some cases, by which the objective compd. is recovered.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公告

⑫ 特許公報(B2)

平5-399

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成5年(1993)1月5日

C 07 H 15/252

7822-4C

// C 12 P 19/56

発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 発酵液からダウノルビシン塩酸塩を回収する改良方法

⑯ 特 願 昭62-196519

⑰ 公 開 平1-42498

⑱ 出 願 昭62(1987)8月7日

⑲ 平1(1989)2月14日

⑳ 発 明 者 ヤーノシュ パーリン ハンガリー国 デブレツェン ベーヒー ウツツア 5
ト

㉑ 発 明 者 ジュジヤンナ エムリ ハンガリー国 デブレツェン カルターチュ ウツツア 36

㉒ 発 明 者 ヨージェフ ファゼカ ハンガリー国 デブレツェン・ヨージヤ ホモカート ウツツア 16

㉓ 発 明 者 アツチラ ヤカブ ハンガリー国 デブレツェン サークタ カー ウツツア 10

㉔ 発 明 者 ジエルジー トーツ ハンガリー国 ニュレジハーザ アラニユ イエー ウツツア 3

㉕ 出 願 人 ビオガル ジョージセルジャール ハンガリー国 デブレツェン バラギ ウツツア 13

㉖ 代 理 人 弁理士 伊藤 武久

審 査 官 横 尾 俊 一

㉗ 参 考 文 献 特開 昭59-118797 (JP, A)

1

① 特許請求の範囲

1 水と溶解しない溶剤による抽出、抽出液の蒸発濃縮、粗生成物の沈殿、及びこの粗生成物のクロマトグラフ的方法による精製によつてダウノルビシン塩酸塩を発酵液から回収する方法において、

上記クロマトグラフ的精製を、蟻酸の含まれたクロロホルムとメタノールとの混合物よりなる溶離剤を用い、そして吸着材としてシリカゲルが含まれたカラムで行ない、ダウノルビシン塩酸塩の含まれたフラクションを蒸発濃縮し、そして生成物を場合により再結晶すること
を特徴とする、改良方法。

2 溶離剤が0.2-2.0容積%の蟻酸を含有し、そして80:20ないし90:10の比率のクロロホルムとメタノールとからなる、特許請求の範囲第1項に従う方法。

2

発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は液体抽出とカラムクロマトグラフィーとを組合わせて利用することによつて発酵液からダウノルビシン塩酸塩を回収するための改善された方法に関する。

〔従来の技術〕

ダウノルビシンは癌に対して有効な構成物質であつて、これは臨床において用いられたアンシラサイクリン型の構成物質の最初のものである。このものはストレプトマイセスの類のバクテリアによつて形成される。この構成物質はイタリア、フランス及びソビエト連邦の研究者によつてそれぞれ独立に1960年代の半ばに分離された〔ベルギー特許第639897号及び同第632391号公報並びに雑誌“Antibiotiki” 11, 763(1966) 参照〕。

ダウノルビシンを生産する各株はその発酵の間

3

に、化学的にダウノルビシンと近似した多数の化合物を作り出す。従つて今日までダウノルビシンの分離と生成のための公知となつてゐる種々の方法は極めて複雑であつた高経費である。純粋物質は一般に種々異なつた有機溶剤を用いて行なわれる多段階の抽出によるか、又は抽出法と吸着法との組合せによつて得られる(1984年にニューヨークの Marcel Dekker から出版された van Damme E.J. 編集の刊行本 "Biotechnology of Industrial Antibiotics" 第569-594頁及び1984年にニューヨークの Alan R. Liss, Inc. から出版された A. Mizurahi-Al van Wezel 編集の刊行本 "Advances in Biotechnological Processes" 第3巻141-161頁参照)。

ベルギー特許第639897号公報によれば発酵液は濾過助剤の存在のもとに濾過される。なお相当に不純物の含まれた生成物であるその粗製のダウノルビシンはその濾過助剤と混合された菌糸及び濾過された発酵液から n-ブタノール又はクロロホルムを用いる多段階抽出によつて別々に分離される。この粗生成物の精製のために n-ブタノールと磷酸塩緩衝液との中で向流抽出が行なわれる。この方法の収率は発酵液の作用物質含有量について21%である。

次に開発されたもう一つの抽出法〔雑誌 "Process Biochem." 14, 6-11(1979) によれば発酵液を先ず n-ブタノールと混合した後、濾過する。濾液の各相を互いに分離し、そのブタノール相を蒸発濃縮する。残渣を n-ヘキサンと混合した後、酸性にした水で抽出する。ダウノルビシンを含有する水性相をアセトンとトルオールとの混合物によつて洗浄し、次いで n-ブタノールの添加によつて粗製のダウノルビシン塩酸塩が析出する。この粗生成物をメタノール/エタノール/クロロホルムの混合物から再結晶する。

吸着法と組合わせた抽出法の場合には、吸着材として、弱酸性のカチオン交換樹脂であるアンバーライト IRC-50(フランス特許第1551195号公報)、カチオン交換樹脂と酸化アルミニウム(ベルギー特許第632391号公報)或はカチオン交換樹脂とシリカゲル〔雑誌 "Folia Microbiol." 22, 275-285(1977) が用いられた。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記の公知の方法はいずれも、種々の異なつた

4

有機溶剤を著しい量で使用しなければならないこと、及びその収率が極めて低いという共通の欠点を有している。各種の有機溶剤を用いる作業はそれらの方法は極めて高経費のものにするばかりでなく、健康保護、環境保護、等の面における一連の対応策を必要とし、それによつてそれらの方法は更に高経費のものとなる。

ダウノルビシン自身は発癌性を有し且つ心臓毒性を示し、従つて根本的な作業保護対策が必要であることが知られている。これはその方法が複雑であればあるほど、また多くの段階を要すれば要するほど実現が困難になる。

本発明の目的はダウノルビシンを簡単に経済的な態様において発酵液から回収し且つ更に精製することができるような方法を開発することであつた。

本発明者等は、その分離法の中にカラムクロマトグラフィー的な段階を組み入れ、その際吸着材として適当な粒度のシリカゲルを、そして溶離剤として蟻酸含有のクロロホルム/メタノール混合物を用いた場合にその精製段階の数を著しく少なくすることができることを見出した。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明に従う方法を次に詳細に説明する。

場合により予め濾過した培養液を弱アルカリ性の条件のもとで n-ブタノールにより抽出する。その抽出液を真空中で蒸発濃縮し、そしてその得られた残渣から塩酸塩の形で作用物質を沈殿させる。そのようにして得られた粗生成物はダウノルビシンに加えてなお多数の特定されていないアンラサイクリングリコシド及びアグルコン類を含んでいる。簡単な唯一回のカラムクロマトグラフィーによつて、その著しく不純物を含んだ粗生成物から純粋なダウノルビシン塩酸塩が得られる。この目的のためには粗生成物をできるだけ少量のメタノールの中に溶解し、そしてその溶液を好ましくは0.063-0.2mmの粒度のシリカゲルが充填されたカラムにチャージする。分離の鋭敏度を高めるためにはシリカゲルをクロロホルムで予め調整された懸濁液の形でそのカラムの中に導入するのが有利である。このために用いられるクロロホルムはメタノールもその他の溶剤も含んではならない。溶離剤としてはクロロホルムとメタノールとの混合物中に蟻酸の含まれた液体が用いら

れ、例えばクロロホルム：メタノール：蟻酸の82：18：1の比率の混合物が用いられる。溶離液は各フラクション毎に捕集してそれらのフラクションを薄層クロマトグラフにより検査する。ダウノルピシン塩酸塩を含んだ各フラクションはその他のフラクションと鮮鋭にわかれている。目的生成物を含んだ各フラクションは蒸発濃縮させる。蒸発濃縮された残渣は1回だけ再結晶し、その際析出したダウノルピシン塩酸塩は薬理学的な諸目的に対して充分に純粋である。発酵液の抗生物質含有量についての収率は60-62%である。このような収率は公知の方法では決して得られないものである。

〔実施例〕

以下、本発明を幾つかの例によつて更に詳細に説明するが、これらは本発明になんらの制限を加えるものでないことを明記する。

例 1

発酵液（作用物質含有量=40γ/ml）500ℓを2%濃度の蔞酸10ℓに室温において加える。この発酵液を45分間攪拌した後、1%の濾過用パーライトを加えて更に30分間攪拌する。次にその菌糸を濾過分離する。この菌糸から抗生物質を回収するためにこのものを2%濃度の蔞酸100ℓで30分間攪拌のもとに洗い出し、次いで濾過する。

合一した濾液（530ℓ）を40%濃度の苛性ソーダで8.0-8.4のpH値に調節し、ついで各200ℓのn-ブタノールを用いて2回抽出する。そのn-ブタノール相を脱イオン水100ℓで洗浄し、1Nの塩酸でpH5.1-5.5に調節し、そして真空中で45℃において蒸発濃縮する。この蒸発濃縮した濃縮液（4.5ℓ）に脱イオン水90mlを加える。ついでそのpH値を6Nのエタノール性塩酸を用いて1.2-1.4に調節する。この混合物を45℃においてその容積の3/4まで蒸発濃縮した後、結晶化を5℃において24時間行なわせる。粗製のダウノルピシン塩酸塩（21g、作用物質含有量=60%）を濾過し、n-ブタノールで洗浄し、そして25℃において真空中で乾燥させる。母液を改めてその容積の3/4まで蒸発濃縮し、そしてもう一度5℃において結晶化を行なわせる。24時間の後に更に7gの生成物（作用物質含有量=58%）が分離され、そしてこれを上述したと同じ方法で洗浄し、乾燥させる。

合一した粗生成物のフラクション（28g）をカ

ラムクロマトグラフィーによつて精製する。このために0.063-0.2mmの粒度のシリカゲル5ℓをクロロホルム中に懸濁させてカラム（直径：高さ=1：20）の中に充填する。前記の粗生成物を1245 mlのメタノール中に溶解してこのカラムにチャージする。次に溶離液体として82：18：1の比率で調整されたクロロホルム、メタノール及び蟻酸の混合物を上記のカラムに導く（流量800ml/hr）。各800mlづつのフラクションを捕集して薄相クロマトグラフィーによりテストする。ダウノルピシンを含んでいて唯一の班紋を与えるフラクションを合一し（12ℓ）、そして真空中で35℃においてその容積の1/100まで蒸発濃縮する。この濃縮物を5℃において24時間放置する。次にダウノルピシン塩酸塩の結晶を濾過し、クロロホルムで洗浄して真空中で25℃において乾燥させる。12.5gの生成物が得られ、これは発酵液の全作用物質含有量について62%の収率である。

元素分析：C₂₇H₂₉NO₁₀HCl（M=563.5）

計算値（%）：C57.50 H5.32 N2.48 Cl6.30

実測値（%）：C57.10 H5.40 N2.51 Cl6.36

融点：188-189℃（分解）

薄層クロマトグラフィー：

1%濃度の蔞酸が含まれているMerckの珪酸ゲル60の上で溶離剤としてn-ブタノール、酢酸及び水の4：1：5の比率の混合物を用いる。Rf=0.4

UV-スペクトル E 1%
1cm（メタノールに溶解）

233nm	620
250nm	440
286nm	138
476nm	201
494nm	199
532nm	115

例 2

500ℓの発酵液を予め菌糸の濾過除去を行わずに、pH8-8.4において（40%濃度の苛性ソーダ溶液で調節）400ℓのn-ブタノールで抽出する。各相を互いに分離し、そしてその有機相を半分の容積の脱イオン水で洗浄する。その洗浄された有機相を例1に記述したと同じ方法で処理する。生成物の収率及び各パラメータは例1におけると同じである。